

CA/913,728

CT/JPC0/00939

日 本 国 特 許 庁

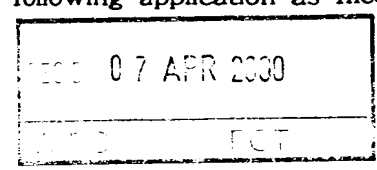
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

18.02.00

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 2月19日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第041936号

出 願 人
Applicant (s):

北村 俊雄

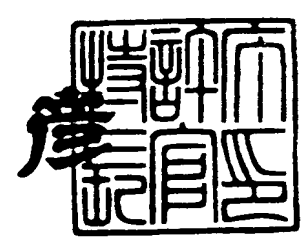
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3019017

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-102

【提出日】 平成11年 2月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金 6 - 1 6 - 2 0 - 4 0 6

 【氏名】 北村 俊雄

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区高輪 2 - 1 6 - 4 2 - 5 0 1

 【氏名】 藤尾 圭志

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都港区白金 6 - 1 6 - 2 0 - 4 0 6

 【氏名又は名称】 北村 俊雄

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規サイトカイン受容体様タンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 4】 配列番号：3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 7】 請求項 6 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体。

。

【請求項 10】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項 11】 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【請求項 1 2】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 2 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物。

【請求項 1 4】 天然由来である、請求項 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 5】 リガンドである、請求項 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 6】 アゴニストである、請求項 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 7】 アンタゴニストである、請求項 1 3 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は血球系細胞で発現する新規なサイトカイン受容体様タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質を利用した化合物のスクリーニング方法、並びに該スクリーニング方法により単離しうる化合物に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

免疫系、造血系の細胞は、サイトカインと呼ばれる一群の液性因子により、その増殖や活性が調節されていることが知られている。これまでに数多くのサイトカインが同定され、それらの解析が進んだ結果、多くのサイトカインは広範な生理活性を有しており、1つのサイトカインが多様な細胞に作用し、細胞によりさまざまな作用を示すことが明らかとなってきた。これらのサイトカインにより、造血細胞やリンパ系細胞、内皮細胞などの細胞間で情報伝達のネットワークが形成されており、これらの細胞の分化や増殖、活性化が制御されていると考えられている（小津真理子ら，1992，サイトカイン療法，南江堂，pp2-14）。サイ

トカインは、特に医療分野における臨床応用が期待されており、癌、感染症、自己免疫疾患、血栓症を含む種々の疾患に対する治療への応用が試みられている。

【0003】

近年、多くのサイトカイン受容体が単離されており、それらの構造上の特徴から、いくつかのグループに分類されている。例えばI型サイトカイン受容体ファミリーには、IL-2 β 受容体を含む多くのインターロイキン受容体やコロニー刺激因子受容体、エリスロポエチン受容体などが含まれ、ヘモポエチン受容体スーパーファミリーとも呼ばれる。I型サイトカイン受容体ファミリーは構造的に共通する特徴を有し、細胞膜直上にトリプトファン-セリン-X-トリプトファン-セリン残基からなるWSボックス、通常それより先端に位置する4つのシステイン残基、フィブロネクチンIII型類似構造を有する。また、細胞内領域の膜の近くにbox1、そのC末側にbox2と呼ばれる比較的相同性の高い部分がある。これらの領域は、細胞内情報伝達にとって必須な領域と考えられている。そのほかのサイトカイン受容体ファミリーとしては、インターフェロン α/β 受容体等が含まれるII型サイトカイン受容体ファミリーや、TNF受容体/NGF受容体ファミリーなど、複数のファミリーが知られている(Miyajima, A. et al., Ann. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331)。

【0004】

このように多数のサイトカイン受容体が同定されているものの、サイトカインの情報伝達には未知の部分も多く、血球系細胞の複雑な情報ネットワークに関与している未知の情報伝達分子が、まだ複数存在しているものと思われる。従って、リンパ球系細胞や造血系細胞で発現する新たなサイトカイン受容体を同定することは、このようなサイトカインのシグナル伝達の解明に留まらず、サイトカインが関与する種々の疾患に対する治療や予防の手段を開発する上でも極めて重要である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、血球系細胞で発現する新規なサイトカイン受容体様タンパク質およびその遺伝子を提供することを課題とする。また、本発明は、該遺伝子が挿入さ

れたベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に結合する抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該タンパク質を利用した、リガンドなどの該タンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、免疫・分化機能に関与する新たな因子若しくはその受容体のクローニングを目指し、独自に開発したシグナルシーケンストラップ (signal sequence trap; SST) 法 (特願平9-324912号) を利用して、分化誘導を行ったリンパ球由来のポリA RNAを材料に、分泌・膜タンパク質をコードするcDNAのスクリーニングを行った。その結果、本発明者らは、I型サイトカイン受容体スーパーファミリー (Miyajima, A. et al., Ann. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331) に属する受容体と相同性を有する新規な受容体様タンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。この遺伝子は、マウス組織の心臓、肺、肝臓、脾臓で発現していた他、Ba/F3、DA-1、CTLL2等の骨髓系・リンパ球系細胞株でも発現が見られた。サイトカイン受容体スーパーファミリーはこれまで多数の、それぞれ機能の異なる分子が同定されており、いずれも生体で免疫系を中心として重要な役割を果たしていることが知られている。本発明の受容体様タンパク質は細胞内にシグナルを伝えるbox1・box2領域と推測できる領域を持っており、遺伝子発現の組織・細胞特異性やその構造上の特徴から、該タンパク質が細胞における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として、特に免疫系で機能することが示唆される。従って該タンパク質は、免疫・分化機能に関与する因子の精製やクローニング、さらには免疫機能関連疾患の医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして有用である。

【 0 0 0 7 】

本発明は血球系細胞で発現する新規な受容体様タンパク質およびその遺伝子に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入

、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(2) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(3) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(4) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

(6) (5) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(7) (6) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(8) (7) に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

(9) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体。

(10) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド、

(11) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、

(12) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) (12) に記載の方法により単離されうる、(1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物、

- (1 4) 天然由来である、(1 3) に記載の化合物、
- (1 5) リガンドである、(1 3) に記載の化合物、
- (1 6) アゴニストである、(1 3) に記載の化合物、
- (1 7) アンタゴニストである、(1 3) に記載の化合物、に関する。

【0 0 0 8】

なお、本発明において、「リガンド」とは、細胞膜に発現する本発明のタンパク質に結合することにより、その機能を活性化するタンパク質を指す。

【0 0 0 9】

また、本発明において「アゴニスト」とは、本発明のタンパク質とリガンドとの結合と同様の現象（本発明のタンパク質の活性化）を引き起こすことができる、本発明のタンパク質に特異的に結合できる分子を指す。

【0 0 1 0】

また、「アンタゴニスト」とは、本発明のタンパク質に特異的に結合することによってその機能を抑制する分子を指す。

【0 0 1 1】

【発明の実施の形態】

本発明は、血球系細胞で発現する新規なサイトカイン受容体様タンパク質に関する。本発明者らにより単離された2つのマウス由来のcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：1および3に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：2および4に示す。これらのタンパク質は、I型サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する既知のタンパク質と相同性を有しており、そのN末端にシグナル配列を持ち、配列番号：2に記載のタンパク質は中間部に膜貫通領域と予想される疎水性に富んだアミノ酸領域を有する。また、データベース上においては有意な相同性を示すアミノ酸配列を有するタンパク質は見出されなかった。従って、本発明者らにより見出されたタンパク質は、I型サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する新規なタンパク質であると考えられる。

【0 0 1 2】

該タンパク質をコードする遺伝子は、リンパ球からクローニングされたことに

加え、ノーザンブロット解析の結果、心臓、肺、肝臓、脾臓に発現が見られ、Ba/F3、DA-1、CTLL2等の骨髓系・リンパ球系細胞株でも発現が見られた。従って、この受容体様タンパク質は、免疫系の機能に関連する因子の精製やクローニング、さらには免疫系関連疾患の治療薬候補化合物のスクリーニングなどのための有用なツールとして利用しうる。また、各種感染症・自己免疫疾患・腫瘍免疫における遺伝子治療などの治療に利用し得る。

【0013】

本発明は、また、配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。

【0014】

本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が受容体タンパク質として機能することを指す。配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、好ましくはI型サイトカイン受容体としての特徴を有する。このような特徴としては、例えばbox1やbox2領域が挙げられる。box1とは、サイトカイン受容体の膜近傍の細胞内領域に存在し、プロリンを多く含有する8アミノ酸からなる領域であり、box2は、C末端よりに存在し、LEVL配列を含む10アミノ酸からなる領域である。共に細胞内情報伝達に重要と考えられているが、特に、box1は、Jak（ヤヌスキナーゼ）とサイトカイン受容体との相互作用に重要と考えられる（Ning Jiang, J. Biol. Chem., 271, 16472-16476 (1996)）。また、配列番号：4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、好ましくは可溶性サイトカイン受容体としての特徴を有する。可溶性サイトカイン受容体とは、細胞外領域のみからなるタンパク質であり、リガンドとの結合活性を有する限り細胞外領域全体であっても、細胞外領域の一部であってもよい。可溶性サイトカイン受容体は、その情報伝達経路により、リガンドの阻害剤にも促進剤にもなり得る（Smith, D.H., Science, 238, 1704-1707 (1987); Novick, D., Cytokine, 4, 6-11 (1992)）。

【0015】

機能的に同等なタンパク質を単離するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれ

ば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492) などを用いて、配列番号：2または4のアミノ酸に適宜変異を導入することにより配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは、15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内であると考えられる。

【0016】

また、変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文

字標記を表す)。

【0017】

配列番号：2または4に記載のタンパク質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、配列番号：2または4に記載のタンパク質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、配列番号：2または4に記載のタンパク質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合蛋白質を作製する方法は、本発明のタンパク質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

【0018】

また、機能的に同等なタンパク質を単離する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用した方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、配列番号：2または4に記載のタンパク質をコードするDNA配列 (それぞれ配列番号：1または3) もしくはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、配列番号：2または4に記載のタンパク質をコードするDNA配列もしくはその一部からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、マウス以外の哺乳動物のホモログ (例えば、ヒト遺伝子がコードするタンパク質) が挙げられる。

【0019】

機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションは、例えば、ストリンジェンシーが、10%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件で行うことができる。より好ましい条件 (

よりストリンジェントな条件) としては、25%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件であり、さらに好ましい条件(さらにストリンジェントな条件) としては、50%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては上記ホルムアミド濃度以外にも複数考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。また、ハイブリダイゼーションにかえて、タンパク質をコードするDNA(配列番号: 1または3)の一部をプライマーに用いる遺伝子増幅法、例えば、PCR法を利用して単離することも可能である。

【0020】

これらハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードする配列番号: 2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、配列番号: 2または4に記載のタンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、通常、70%以上の相同性、好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性である。蛋白質の相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0021】

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、例えば、膜結合型と予想されるタンパク質であれば、該タンパク質の膜結合に必要な領域以外の部分を細胞外に分泌させる。次いで、この細胞の培養上清を回収し、濃縮した後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製することが可能である。また、本発明のタンパク質をグルタチオンSトランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞(例えば、動物細胞や大腸菌など)内で発現させ、発現させた組み換えタンパク質

をグルタチオンカラム、あるいはニッケルカラムにより精製する。その後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去する方法により調製できる。天然のタンパク質であれば、例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞の抽出物に対し、後述する本発明の抗体が結合したアフィニティーカラムを作用させて精製することにより単離することができる。

【0022】

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドは、少なくとも70アミノ酸、好ましくは100アミノ酸以上、さらに好ましくは130アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合するリガンドなどの化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製などに利用し得る。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質からシグナルペプチドが除去された形態のタンパク質や細胞内の領域を除去した形態のタンパク質が含まれる。また、例えば、リガンドとの結合能を有するが細胞内へのシグナル伝達を行う能力のない部分ペプチド（本発明のタンパク質の競合阻害剤として機能する）が含まれる。本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

【0023】

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

【0024】

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1または3に記載のDNA配列）の一部をプロー

ブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。また、本発明のタンパク質を発現している細胞よりRNAを調製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1または3に記載のDNA配列）に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

【0025】

本発明のDNAは、本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として生産するために利用することができる。また、本発明のタンパク質をコードするDNAに欠陥がある場合には、アンチセンスによる機能阻害や、正常な遺伝子に置き換える遺伝子治療などへの応用も考えられる。

【0026】

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明のDNAの発現させうるものであれば特に制限はない。例えば、宿主を大腸菌とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、PCR-Scriptなどが挙げられる。またcDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合も上記ベクターの他に、pGEM-T、pDIRECT、pT7などがあげられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1Blueなどの大腸菌とした場合には、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター（例えば、lac,T7など）を持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

【0027】

また、CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター（SV40, MMLV-LTR, EF1 α , CMVプロモーターなど）を持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

【0028】

さらに、細胞内でのコピー数の増幅を目的とした宿主ベクター系においては、安定産生細胞株の場合は、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を用いメトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製機転を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。

【0029】

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込みレトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターに特に制限はないが、pAdexlcwやpZIPneoなどが挙げられる。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning, 5.61-5.63）。

【0030】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。大腸菌では、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、動物細胞においては、例えば、CHO細胞、COS細胞、3T3細胞、HeLa細胞などが挙げられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン

酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、本発明のタンパク質と結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどに本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

【 0 0 3 2 】

本発明の抗体は、以下の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムにより、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分から免疫グロブリンGあるいはMを、プロテインA、あるいはプロテインGカラムにより精製することにより調製することができる。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、本発明の抗体を免疫関連疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。抗体治療に用いる場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【 0 0 3 3 】

また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【0034】

さらに、本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

【0035】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0036】

本発明はまた、配列番号：1 または 3 に示される塩基配列からなるDNAまたは該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAに関する。特異的にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼー

ション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAには、本発明のタンパク質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

【0037】

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法、並びに該スクリーニング方法により単離する化合物（例えば、リガンド、アゴニスト、およびアンタゴニスト）に関する。

【0038】

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、精製した蛋白質やその部分ペプチドであっても、細胞表面に発現させた形態、膜画分としての形態であってもよい。

【0039】

このスクリーニング方法の一つの態様は、（a）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、（b）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。このスクリーニング方法に用いられる被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、タンパク質、ペプチド、合成低分子化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、可溶型タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、また、細胞膜画分として、被検試料に接触させることができる。

【0040】

本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に対するリガンドを単離する方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。例えば、リガンドを発現していることが予想される細胞（例えば、T細胞など）よりファージベクター（ λ gt11, ZAPなど）を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、本発明のタ

ンパク質をビオチンラベル、あるいはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、結合するタンパク質を発現しているプラークを、ストレプトアビジン、あるいは抗GST抗体により検出する「ウエストウエスタンブロッティング法」(Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, and Schlessinger J (1991) Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression /cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. Cell 65, 83-90) により調製することが可能である。また、本発明のタンパク質をSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、リガンドを発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離して大腸菌に導入して発現させる(酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)「twoハイブリッドシステム」(「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもclontech社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene社製)、文献「Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」)に従い調製することも可能である。

【0041】

また、本発明蛋白質と特異的に結合するリガンドのスクリーニングは、本発明蛋白質の細胞外ドメインとシグナル伝達能を有するヘモポエチン受容体などの既知の受容体蛋白質の細胞膜貫通ドメインを含む細胞内ドメインとを連結せしめて作製したキメラ受容体を、適当な細胞株、好ましくは適当な増殖因子の存在下でのみ生存および増殖可能な細胞株(増殖因子依存性細胞株)の細胞表面に発現せしめた後、該細胞株を種々の増殖因子、サイトカイン、または造血因子等を含むことが期待される材料を添加して培養することにより実施可能である。この方法は、被検材料中に本発明蛋白質の細胞外ドメインと特異的に結合するリガンドが

存在する場合にのみ、上記増殖因子依存性細胞株が生存および増殖が可能であることを利用している。既知のヘモポエチン受容体としては、例えば、トロンボポエチン受容体、エリスロポエチン受容体、G-CSF受容体、gp130等が挙げられるが、本発明のスクリーニング系に用いるキメラ受容体のパートナーは、これら既知のヘモポエチン受容体に限定されるものではなく、細胞質ドメインにシグナル伝達活性に必要な構造を備えているものであれば何を用いても構わない。例えば、TNF受容体スーパーファミリーに属するOX40受容体をキメラ受容体のパートナーとして選択することができる (Mallet, S. et al., EMBO J., 19, 1063-1068 (1990))。OX40受容体は、細胞内に正のシグナルを伝達することができることから、増殖反応等を指標としてリガンドのスクリーニングを行うことができる (Baum, P.R. et al., EMBO J., 13, 3992-4001 (1994))。増殖因子依存性細胞株としては、例えば、BaF3やFDC-P1を初めとしたIL3依存性細胞株を利用することが可能である。

【0042】

さらに、本発明のタンパク質を、そのリガンドを発現していない細胞で発現させ、次いで、該細胞に、リガンドを発現していることが予想される細胞より構築した発現cDNAライブラリーをCOSなどの細胞に導入して得た培養上清を添加し、そして該細胞のある種の変化（例えば増殖活性などの機能的変化または形態的变化を含む）を指標にリガンドを探索する「ダイレクト発現クローニング法」(Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, Devries JE, Lee F, and Arai K. (1986) Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. Proc Natl Acad Sci U S A. 83, 5894-5898) により調製することも可能である。これらのスクリーニング方法は、本発明のタンパク質に対する抗体や、本発明のタンパク質に結合する化合物を被検試料として用いたアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに用いることも可能である。

【0043】

さらにまた、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムに本発明の

リガンドを発現していることが予想される細胞の培養上清をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより調製することも可能である。得られたタンパク質（リガンド）のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該リガンドをコードするDNAを得ることが可能である。

【0044】

さらにまた、本発明の蛋白質の細胞外領域と、抗体（例えばヒトIgG抗体）のFc領域とのキメラ蛋白質として発現し、プロテインAカラム等を用いて精製することができる。このような抗体様キメラ蛋白質は、リガンドの結合活性を有することから、適宜、放射性同位元素等で標識した後、リガンドのスクリーニングに用いることができる（Suda, T. et al., Cell, 175, 1169-1178 (1993)）。また、TNFファミリー分子などのある種のサイトカインでは、その多くが膜結合型でも存在することから、各種の細胞と抗体様キメラ蛋白質を反応させて、結合活性を示した細胞から、リガンドを単離する事ができる可能性もある。また、cDNAライブラリーを導入した細胞を用いて同様にリガンドを単離することができる。さらに、抗体様キメラ蛋白質をアンタゴニストとして用いることも可能である。

【0045】

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に対するアゴニスト、およびアンタゴニストを単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、化合物、または天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9)が当業者に公知である。

【0046】

これにより単離されたりガンド、アゴニスト、アンタゴニストは、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質が関与する疾患（例えば、免疫系関連疾患）の治療への応用が考えられる。

【0047】

本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、薬剤として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われると考えられる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

【0048】

例えば、本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0049】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あるいは、体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

【0050】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0051】

【実施例】

〔実施例 1〕 シグナルシーケンスストラップ (SST)法によるリンパ球 cDNAライブラリーのスクリーニング

マウスオボアルブミン (OVA) のアミノ酸 323~339に特異的なT細胞レセプターのトランスジェニックマウス、OVA-23-3は既に確立されている (Satoら, 1994, Eur. J. Immunol., vol.24, p.1512)。OVA-23-3マウスの脾臓細胞をOVA323-339ペプチド、抗原提示細胞、インターロイキン2、インターロイキン12及び抗インターロイキン4モノクローナル抗体存在下で培養する事により、Th1型のサイトカインを分泌するリンパ球に分化し、またOVA323-339ペプチド、抗原提示細胞、インターロイキン2、インターロイキン4及び抗インターロイキン12モノクローナル抗体存在下で培養する事によりTh2型のサイトカインを分泌するリンパ球に分化することが既に示されている (Ohtaら, 1997, Journal of Immunological Methods, vol.209, p.85)。

【0052】

そこで、上記のOhtaらの方法によりTh1型、Th2型に分化させたリンパ球よりFast Track(Invitrogen)を用いてpolyA(+)RNAを調製した。SuperScript Choice System(GIBCO BRL)のランダムヘキサマーを用いて二本鎖cDNAを合成した。cDNAの末端平滑処理後BstXIアダプター(Invitrogen)を付加し、SizeSep 400 Spun Column(Pharmacia)を用いて400bp以上のcDNAを分画した。別にBstXI(宝酒造)及びBAP処理した pMX GM(-)v-mp1^{M2} (特願平9-324912号参照)と混合後 T4 DNA ligaseを作用させて連結した。これをGene Pulser (Bio Rad)を用いて電気穿孔法にて大腸菌 DH10B (GIBCO BRL)に導入してcDNAライブラリーを構築した。

【0053】

ライブラリー組換え大腸菌から抽出したプラスミドを JETstarカラム (GENOME D)を用いて精製した。パッケージング細胞 BOSC23(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.90: 8392-8396, 1993)に LipofectAMINE (LIFE TECHNOLOGIES)を用いてプラスミドcDNAライブラリーをトランスフェクトした。BOSC23を10%ウシ胎児血清 (FCS, JRH BIOSCIENCES)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LIFE TECHNOLOGIES)で6cm dish (Corning)に播き込み16時間後、DMEMで洗浄し、先に200 μ l DMEMで希釈した18 μ l LipofectAMINEと200 μ l DMEMで希釈したプラスミ

ド 3 μ g を混ぜて15分間室温で放置したものに1.6ml DMEMを混ぜて細胞に加えた。5時間後 2ml の20%FCSを含むDMEMを加え19時間培養した。その後 3mlの10% FCSを含むDMEMに置換し24時間後にその培養上清を回収した。この組み換えウイルスを含む培養上清にマウスinterleukin-3(IL-3)及び10 μ g/ml hexadimethrine bromideを加え、これにBa/F3細胞を懸濁して感染させた。感染させて24時間後細胞をリン酸緩衝液にて3回洗浄し10%FCSを含むRPMI1640にて培養を続けた。

【0054】

IL-3非存在下で増殖してきたクローンから染色体DNAを抽出し、cDNA挿入部位を挟むように設定したプライマー (5'-gggggtggaccatcctcta-3' /配列番号: 5、および 5'-cgcgagctgtaaacggtag-3' /配列番号: 6) を用いてPCRを行いcDNA断片を回収した。PCRは500ng染色体DNA、500pM 各プライマー、TaKaRa LA Taq (宝酒造) 2.5単位、2.5mM $MgCl_2$ 、0.3mM dNTPs及び酵素添付緩衝液を含む反応液50 μ lについてGeneAmpPCR System 2400で以下の条件にて行った。98℃、60秒の変成後、「98℃,20秒、68℃,120秒」のサイクルを30回行った。PCR反応物をアガロース電気泳動にかけ増幅された断片を含む部分を切り出し、DNAを精製した。得られたDNA断片についての塩基配列を決定したところ、I型サイトカイン受容体スーパーファミリー受容体と相同性を有するサイトカイン受容体様タンパク質をコードするcDNAの一部であることが明らかとなった。

【0055】

[実施例2] 全長cDNAのクローニングと塩基配列決定

完全長cDNAを得るためにTh2型リンパ球cDNAライブラリーをoligo dTプライマーで合成し、上記cDNA断片をプローブにスクリーニングした。具体的にはTh2型リンパ球polyA(+)RNAからSuperScript Choice System (GIBCO BRL)のoligo dTプライマーを用いて二本鎖cDNAを合成した。cDNAの末端平滑処理後BstXIアダプター(Invitrogen)を付加し、SizeSep 400 Spun Column (Pharmacia)を用いて400bp以上のcDNAを分画した。別にBstXI(宝酒造)及びBAP処理したpME 18s (Liu, Y.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(19), 8957-8961 (1993))と混合後T4 DNA ligaseを作用させて連結した。これをGene Pulser (Bio Rad)を用いて電気穿孔法にて大腸菌 DH10B (GIBCO BRL)に導入してcDNAライブラリーを構築した。

。ライブラリー組換え大腸菌から抽出したプラスミドをJETstarカラム(GENOMED)を用いて精製した。

【 0 0 5 6 】

先にSST法にて得られたDNA断片 $0.1\mu\text{g}$ を鋳型にその内部プライマー(50pmole) (22115; $5' - \text{ggtgatgtcacagtcgtctgccatg} - 3'$ / 配列番号 : 7、および22113; $5' - \text{acggtccgcaggagtagcagtaa} - 3'$ / 配列番号 : 8)、 2.5mM MgCl_2 、 0.2mM dATP 、 dGTP 、 dCTP 、 0.1mM dTTP 、 $10\mu\text{M Biotine-21-dUTP}$ 、 2.5 単位Takara LA Taq (宝酒造) 及び酵素添付緩衝液を含む反応液 $50\mu\text{l}$ についてGeneAmpPCR System 2400で 98°C 、 60 秒の變成後、「 98°C 、 20 秒、 59°C 、 20 秒、 74°C 、 60 秒」のサイクルを 30 回行いビオチン化した。このビオチン化DNA 100ng を含む $14.9\mu\text{l}$ 水溶液を 100°C 5 分變成急冷後、 2mM CoCl_2 、 $30\text{mM TrisHCl pH}8.0$ 、 8mM MgCl_2 、 $1.6\text{mM ATP}[\gamma\text{S}]$ 、 $80\mu\text{M ATP}$ (それぞれ最終濃度) 及び $4\mu\text{g recA}$ を加え、 37°C 15 分間保温後上記プラスミドcDNAライブラリーを $5\mu\text{g}$ 加え(最終容量 $30\mu\text{l}$)更に 20 分間保温した。HindIII消化しDNAを 50ng 加え 5 分後、 10% SDSを $0.6\mu\text{l}$ 、 $14\text{mg/ml ProteinaseK}$ を $0.4\mu\text{l}$ 加え 10 分間保温後 50mM PMSF を $2\mu\text{l}$ 加えて反応を停止させた。ここに鮭精巢DNAでblocking処理したStreptavidin MagneSphere (Promega)を加え、 20 分間吸着させた。 0.05% Tween20を含む $10\text{mM TrisHCl pH}7.5$ 、 1mM EDTA 、 1M NaCl で 1 回、 $10\text{mM TrisHCl pH}7.5$ 、 1mM EDTA 、 2M NaCl で 3 回洗浄後、さらに蒸留水で 1 回洗浄し 1mM EDTA 、 0.1N NaOH でDNAを溶出させた。

【 0 0 5 7 】

これをエタノール沈殿後 Gene Pulser (Bio Rad)を用いて電気穿孔法にて大腸菌DH10B (GIBCO BRL)に導入し、 $50\mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有培地上にて組み換え体を選択した。

【 0 0 5 8 】

得られたコロニーからプラスミドを抽出し、上記のrecA反応を再度行い、アンピシリン含有培地上にて組み換え体を選択した。上記の22115及び22113を用いて同様の条件にてコロニーPCRを行った。約 400 塩基のバンドが得られた陽性コロニーからプラスミドを抽出して挿入cDNAの塩基配列を決定した。

【 0 0 5 9 】

上記操作により2種類のクローンが得られ、一方(「215L」と称する)は1278塩基のcDNA(配列番号: 1)が得られ、359アミノ酸残基(配列番号: 2)をコードするオープンリーディングフレーム(59~1135位)が認められた。1~24アミノ酸がシグナル配列、231~253アミノ酸が膜貫通ドメインと推定される。また細胞外ドメインについては、IL-2 γ 等のI型サイトカイン受容体スーパーファミリーで保存されているシステイン、WSボックス(201~205アミノ酸)領域等について比較的高い相同性を示した。また細胞内ドメインについては262~269アミノ酸、311~322アミノ酸がそれぞれbox1・box2と呼ばれるサイトカイン受容体に共通で、シグナル伝達に重要と推測されている構造との相同性を示した。

【0060】

もう一方(「215S」と称する)は804塩基(配列番号: 3)よりなり、188アミノ酸残基(配列番号: 4)をコードするオープンリーディングフレーム(98~661位)が認められた。シグナル配列以下175アミノ酸までは全く215Lと相同であるが、膜貫通ドメイン以下に相当する部位を欠失しており、各種サイトカインレセプターに多く見られる可溶型と考えられた。

【0061】

【実施例3】 ノーザンブロッティング

マウスMultiple Tissue Northern (MTN) Blot(clontech)を用いて得られたcDNA断片をプローブにハイブリダイゼーションを行ったところ心臓、肺、肝臓、および脾臓においてシグナルが認められた。マウス培養細胞株ではBa/F3, DA-1, C TLL2等骨髓球系・リンパ球系細胞株での発現が認められた。

【0062】

【発明の効果】

本発明により、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属すると考えられる新規なサイトカイン受容体様タンパク質およびそれらの遺伝子が提供された。サイトカイン受容体スーパーファミリーはこれまで多数の、それぞれ機能の異なる分子が同定されており、いずれも生体で免疫系を中心として重要な役割を果たしていることが知られている。従って、本発明のタンパク質や遺伝子は、免疫・分化機能に関与する新たな因子の精製やクローニング、さらには医薬品候補化合物

のスクリーニングのための有用なツールとして利用しうる。

【 0 0 6 3 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KITAMURA, Toshio

<120> Cytokine receptor-like proteins

<130> C1-102

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1278

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(1135)

<400> 1

accggctcgg accgaaccag ctgtcaatca ctgcagcgtc cgcgccccg ccggcgac 58

atg gca tgg gca ctc gcg gtc atc ctc ctg cct cgg ctc ctt acg gcg 106

Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala

1 5 10 15

gca gcg gcg gcg gcg gcg gtg acg tca cgg ggt gat gtc aca gtc gtc 154

Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val

20 25 30

tgc cat gac ctg gag acg gtg gag gtc acg tgg ggc tcg ggc ccc gac 202

Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp

35 40 45

cac cac ggc gcc aac ttg agc ctg gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc 250

His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala

50 55 60

ctg caa ccc tgc ccg cga tat ttc ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc 298

Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser

65 70 75 80

ggg tgc atc ctc ccc gcg gcg agg gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg 346

Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu

85 90 95

cgc gac gga ggc ggg gcc atg gtg ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc 394

Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser

100 105 110

gcc tgg ctg aag ccc cgc cca cct tgg aat gtg acg ctg ctc tgg aca 442

Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr

115

120

125

cca gac ggg gac gtg act gtc tcc tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc 490

Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly

130

135

140

ctg gac tac gag gtg cag cac cgg gag agc aat gac gat gag gac gcc 538

Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala

145

150

155

160

tgg cag acg acc tca ggg ccc tgc tgt gac ttg aca gtg ggc ggg ctc 586

Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu

165

170

175

gac ccc gcg cgc tgc tat gac ttc cgg gtt cgg gcg tgc ccc cgg gcc 634

Asp Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala

180

185

190

gcg cac tat ggc ctg gag gcg cag cct agc gag tgg aca gcg gtg aca 682

Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr

195

200

205

agg ctt tcc ggg gca gca tcc gcg gcc tcc tgt acc gca agc ccc gcc 730

Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Thr Ala Ser Pro Ala

210

215

220

cca tcc ccg gcc ctg gcc ccg ccc ctc ctg ccc ctg ggc tgc ggc cta 778
 Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240

gca gcg ctg ctg aca ctg tcc ctg ctc ctg gcc gcc ctg agg ctt cgc 826
 Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Leu Arg
 245 250 255

agg gtg aaa gat gcg ctg ctg ccc tgc gtc cct gac ccc agc ggc tcc 874
 Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val Pro Asp Pro Ser Gly Ser
 260 265 270

ttc cct gga ctc ttt gag aag cat cac ggg aac ttc cag gcc tgg att 922
 Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile
 275 280 285

gcg gac gcc cag gcc aca gcc ccg cca gcc agg acc gag gag gaa gat 970
 Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp
 290 295 300

gac ctc atc cac ccc aag gct aag agg gtg gag ccc gag gac ggc acc 1018
 Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr
 305 310 315 320

tcc ctc tgc acc gtg cca agg cca ccc agc ttc gag cca agg ggg ccg 1066
 Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro
 325 330 335

gga ggc ggg gcc atg gtg tca gtg ggc ggg gcc acg ttc atg gtg ggc 1114

Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly

340

345

350

gac agc ggc tac atg acc ctg tgaccttgaa gtcactgccca gtctatactt 1165

Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu

355

caggctgagg tcacttcctg tctttaaata attcaaactc acaaatcctg tgccctgtctg 1225

tatgcaaatg tggtcacgaa tattcaaata aaatgcaaata gctatgctaa aaa 1278

<210> 2

<211> 359

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala

1

5

10

15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val

20

25

30

Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp

35

40

45

His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala

50

55

60

Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser
65 70 75 80

Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser
100 105 110

Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr
115 120 125

Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly
130 135 140

Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala
145 150 155 160

Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu
165 170 175

Asp Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala
180 185 190

Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr
195 200 205

Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Thr Ala Ser Pro Ala

210

215

220

Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Cys Gly Leu

225

230

235

240

Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Leu Arg

245

250

255

Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val Pro Asp Pro Ser Gly Ser

260

265

270

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile

275

280

285

Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp

290

295

300

Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr

305

310

315

320

Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro

325

330

335

Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly

340

345

350

Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu

355

<210> 3

<211> 804

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(661)

<400> 3

cgttttcggc tctaagcggc ctgggcgccc tcgactcgga ccggctcgga ccgaaccagc 60

tgtcaatcac tgcagcgtcc gcggccccgc cggcgac atg gca tgg gca ctc gcg 115

Met Ala Trp Ala Leu Ala

1

5

gtc atc ctc ctg cct cgg ctc ctt acg gcg gca gcg gcg gcg gcg gcg 163

Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

10

15

20

gtg acg tca cgg ggt gat gtc aca gtc gtc tgc cat gac ctg gag acg 211

Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val Cys His Asp Leu Glu Thr

25

30

35

gtg gag gtc acg tgg ggc tcg ggc ccc gac cac cac ggc gcc aac ttg 259

Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His His Gly Ala Asn Leu

40

45

50

agc ctg gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc ctg caa ccc tgc ccg cga 307
 Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala Leu Gln Pro Cys Pro Arg
 55 60 65 70

tat ttc ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc ggg tgc atc ctc ccc gcg 355
 Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Leu Pro Ala
 75 80 85

gcg agg gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg cgc gac gga ggc ggg gcc 403
 Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu Arg Asp Gly Gly Gly Ala
 90 95 100

atg gtg ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc gcc tgg ctg aag ccc cgc 451
 Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser Ala Trp Leu Lys Pro Arg
 105 110 115

cca cct tgg aat gtg acg ctg ctc tgg aca cca gac ggg gac gtg act 499
 Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr Pro Asp Gly Asp Val Thr
 120 125 130

gtc tcc tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc ctg gac tac gag gtg cag 547
 Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Val Gln
 135 140 145 150

cac cgg gag agc aat gac gat gag gac gcc tgg cag acg acc tca ggg 595
 His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala Trp Gln Thr Thr Ser Gly
 155 160 165

ccc tgc tgt gac ttg aca gtg ggc ggg gcc acg ttc atg gtg ggc gac 643

Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly Asp
 170 175 180

agc ggc tac atg acc ctg tgaccttgaa gtcactgccca gtctatactt 691
 Ser Gly Tyr Met Thr Leu
 185

caggctgagg tcacttcctg tctttaata attcaaactc acaaatcctg tgcctgtctg 751

tatgcaaatg tggtcacgaa tattcaaata aaatgcaaat gctatgctaa aaa 804

<210> 4

<211> 188

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val
 20 25 30

Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp
 35 40 45

His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala
 50 55 60

Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser
65 70 75 80

Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser
100 105 110

Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr
115 120 125

Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly
130 135 140

Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala
145 150 155 160

Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Ala
165 170 175

Thr Phe Met Val Gly Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu
180 185

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

gggggtggac catcctcta

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

cgcgagctg taaacggtag

20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

ggtgatgtca cagtcgtctg ccatg

25

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

acgggtccgca ggagtagcag taa

23

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なサイトカイン受容体様タンパク質を提供することを課題とする。

【解決手段】 独自に開発した膜分泌タンパク質をコードする遺伝子の特異的クローニング法を用いることにより、分化誘導したリンパ球由来 cDNAライブラリーから、I型サイトカイン受容体スーパーファミリーに相同性を有する新規なサイトカイン受容体様タンパク質をコードする遺伝子を単離した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599002744]

1. 変更年月日	1998年11月25日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区白金6-16-20-406
氏 名	北村 俊雄

